

学術研究助成金〔独創的・先駆的研究〕実績報告書

令和7年5月1日 提出

関連する持続可能な開発目標（SDGs）

	1 貧困		2 飢餓	●	3 保健		4 教育
	5 ジェンダー		6 水・衛生		7 エネルギー		8 経済成長と雇用
●	9 インフラ、産業化、イノベーション		10 不平等		11 持続可能な都市		
	12 持続可能な消費と生産		13 気候変動		14 海洋資源		
	15 陸上資源		16 平和		17 実施手段		

1 課題番号： 24 独先 15

2 研究者（研究代表者）

② 所属部科校： 薬学部

②資格・氏名： 教授 ・ 宮坂 知宏

3 研究課題

①和文表記： 微小空間における化学量論的生命科学解析の実践とアルツハイマー病
病態研究への応用②英文表記： Research on the pathogenesis of Alzheimer's disease based on the
novel stoichiometrical molecular analyses in intracellular micro-regions.

4 研究期間：令和6年度～令和7年度

5 現在までの達成度

※当初の研究目的に対する達成度について、自己評価を行ってください

①区分 A：当初の計画以上に進展している，B：概ね順調に進展している，C：やや遅れている

②達成度 研究期間全体（2年間）を100%とした場合に、現在の進捗状況を〇〇%で評価してください

②区分： B

②達成度： 40 %

6 研究組織

①研究代表者

資 格・氏 名 (研究者番号)	所属部科校 実施研究所	役 割 分 担
教授・宮坂 知宏 (90342857)	薬学部・薬学研究所	研究の統括、iPaa 解析、IUE 法によるモデル作成

②研究分担者

専任講師・徳田 栄一 (00757510)	薬学部・薬学研究所	リコンビナントタンパク質の精製、In vitro タウ凝集解析
准教授・宮岸 寛子 (30642417)	薬学部・薬学研究所	マウス脳スライス培養の作成と薬理的解析
助教・田中 融 (30823702)	薬学部・薬学研究所	薬剤誘導タウ発現モデルの提供と薬理的解析

7 研究目的

生命活動の源は、生体内における様々な分子の動力的相互作用による。したがって、健康状態の維持やその破綻による疾患の形成は、これら反応に関わる因子それぞれの濃度（化学量）及びその変化によって決定される。さらにこのような生体因子の相互作用が組織・細胞中の特定の領域で行われる事実を考慮すると、生命現象の正確な理解には微小空間に局限した生体分子の絶対的化學量を可能とする解析が必要である。これを化學量論的生命科学（Stoichiometric Biology）と定義する（図1）。

申請者らは、従来の免疫組織染色法に濃度既知の抗原を含有する検量線ゲルブロックを同包することで、細胞内の任意の微小空間におけるタンパク質の化學量を求められる実験手法（immunoPathological Absolute Quantification：iPaa 法）を提案した（図2）。本研究の目的は、この iPaa 法の最適化とともに、この方法を用いてタウ濃度変化組織モデル実験系の構築と神経変性に向けたタウ濃度変化の絶対定量を目指すものである。さらにその成果により、新たな AD

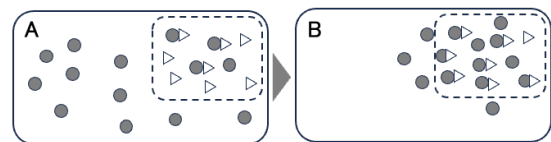


図1 化學量論的生命科学の概念

2つの因子（●,▷）間の相互作用を考える。仮に相互作用が点線で囲まれた空間でのみ行われる場合、●の集積は点線領域内における濃度上昇と捉えられる。しかし、実線の領域全体を対象とした定量ではこの局所的濃度変化は捉えられない。また、▷との分子間相互作用の理解には、双方の局所化學量を求める必要がある。この実践には微小領域における生体分子の絶対定量法が必須となる。

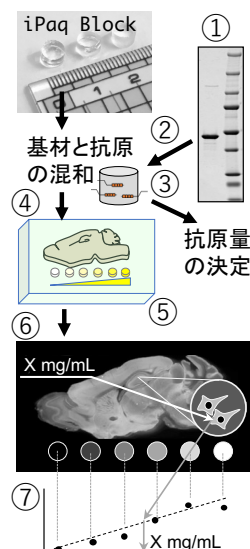


図2 iPaa法の概要

①抗原として適切な精製タンパク質もしくは合成ペプチドを準備し、②独自に化学合成した iPaa アガロース誘導体（iPaq gel）に共有結合させる。③その一部をとり、結合した抗原を定量し、④既知の濃度の抗原を含む検量線ブロックとする。⑤これらを標本と共にパラフィン切片とし、⑥IHCを行い、⑦得られた検量線ブロックの発色強度から検量線を作製、組織中の局所について最小1 pixel 単位でのタンパク質濃度が求められる。

治療薬開発方針とともに医学生命科学研究における化学量論的生命科学解析の意義について提唱することである。

8 研究概要

生命活動さらにはその破綻である疾患を正確に理解するためには、その反応が生じている組織細胞の局所における分子の拡散、集積、移動といった濃度変化を捉える必要がある。また、複数の因子の相互作用を理解するためには、それぞれ個別の因子の相対的な濃度変化を知るだけでは正確な理解に至らない。双方の特定領域中における絶対的分子濃度（モル濃度）を求めたうえで比較解析する必要がある。これを化学量論的生命科学と定義する。

タンパク質の定量・解析法には主に生化学的手法と組織学的手法がある。ウェスタンブロット法など既存の生化学的手法では標準物質を検量線として用いることにより正確な絶対定量が可能である。一方、その空間的な解像度はホモジナイズに供する組織の解剖精度に依存し、一定の組織容量における平均値となる。これに対し、組織学的手法では生体の微細構造を維持したまま抗体染色を行うため、各細胞ごとの解析など空間的な解像度に優れている。しかし、得られる情報は比較定量が限界である。したがって、細胞局所における因子を絶対定量出来る手法はなく、これまで化学量論的生命科学解析の達成困難であった。

iPaq 法では、任意の濃度の対象タンパク質を含包できるブロック基材（iPaq gel）を作成し、解析対象となる組織とともにパラフィン包埋切片を作成する。この切片を免疫染色し、蛍光顕微鏡下で撮像、染色の輝度を定量化する。得られた検量線ブロックの輝度を元に検量線を作成し、組織中の輝度から対象タンパク質の局所絶対濃度を求めるものである（図2）。理論上、蛍光顕微鏡で撮像される画像 1 pixel の解像度での解析が可能であり、理論上 0.1 μm^2 の範囲の濃度決定が可能である。これは細胞小器官や神経細胞の軸索・シナプス、スバインなども対象にできる解像度である。同様の解析法の報告は無く、極めて独創的な試みと言える。研究課題名にも掲げた化学量論的生命科学の実施には iPaq 法は必須であり、世界に先駆けて我々こそ、その可能性を明示できると考えている。

本研究では以下の研究項目について遂行する。

- (1) iPaq gel の最適化（宮坂）：iPaq 法の最大の弱点は耐熱性である。これは多くの免疫組織染色法では染色性向上のため抗原賦活化が用いられているが、熱で融解する現状の gel では試用できる抗体は限られる。そのためブロック作成あるいは薄切後に化学的処理を施すことで iPaq gel 耐熱化を実現する。また、本解析に用いる抗原リコンビナントタウの精製を可能とする。iPaq gel の解析手順を再検証し、作業時間の短縮とより正確な gel 結合タンパク質量の決定を可能とする。
- (2) マウス脳におけるタウ/チューブリンの網羅的空間濃度決定（宮坂・徳田）：タウ、チューブリンの免疫組織染色に抗原賦活化は不要であるため、これらの濃度決定は iPaq gel の耐熱性獲得を待たず課題開始とともに取り組むことが出来る。はじめに、チューブリンなど他分子の定量化に向けてペプチド抗原による iPaq 解析の可能性について検証する。さらにタウ病変形成に向けてタウの関連タンパク質である MAP2 の定量は重要課題である。マウス脳 MAP2 の定量にむけて標準品とする長鎖 isoform MAP2b の精製を行う。タウ病変形成解析を目的とした iPaq 解析は野生型マウスおよび PS19 タウトランスジェニックマウスを対象とする。これらのマウスの本学への導入と繁殖を行い、令和7年度にむけた

解析の準備とする。また、令和7年度に向けた(4)の解析のため、in vitro タウ凝集系が必要である。これに向けて、現在最も広く信頼され用いられている dGAE タウフラグメントの精製と凝集実験系を構築する。

- (3) マウス脳におけるチューブリン発現抑制系の導入と病態解析（宮坂）：チューブリンの濃度低下はタウ病変形成のリスクと考えられる。既に培養細胞での有効性を認めているチューブリンシャペロンの発現抑制によるチューブリン de novo 新生抑制法をマウスに応用しその効果について検証する。
- (4) タウ異所性発現モデルの作成と解析（宮坂・宮岸・田中）：これまでの研究でグルタミン酸刺激により樹状突起での異所性なタウの翻訳が起こることを発見している。本研究ではこのモデルを海馬培養スライスで再現し、より認知症の細胞内環境に近い条件でタウの局所濃度と病態形成との関係について検証する。はじめに培養スライスの作製および培養・解析条件を確定し、グルタミン酸刺激によるタウの発現について確認する。さらに確定した条件下においてタウの局所濃度の変化を iPaq 法にて確認する。

9 研究結果

(1) iPaq gel の最適化

本研究の基幹技術である iPaq 法は、一般的な免疫組織染色法を応用したものである。通常、組織は腐敗や劣化を防ぐためにホルマリンなどによる固定を施す。この過程ではタンパク質同士が架橋されることで構造が保持される。一方この架橋により、例えばエピトープがタンパク質内部または他の因子との会合面など抗体のアクセスに立体障害がある場合は染色できない。このような場合に抗原賦活化を行うが、その手法の多くに高温処理が含まれる。組織染色の際、抗原賦活化を要する抗体は極めて多く、iPaq 法の幅広い応用を目指すためには iPaq gel の耐熱化が求められる。Gel 作製～抗原結合～ブロック形成までは本来の agarose としての性質が必要な為、ブロック作製または薄切後の耐熱化処理法の開発が急務であった。解析は Aga-Epo1 からなる iPaq ブロックとマウス脳を共包埋させ、作製した切片に複数の候補処理法を施し、比較した。その結果、処理無しでは 100°C の熱水処理で消失する gel が処理条件 B（特許申請の関係で秘匿とする）処理では残存することを確認した（図3）。今後抗体染色への影響を含め定量的な解析から最適法を決定し、特許申請することを予定している。

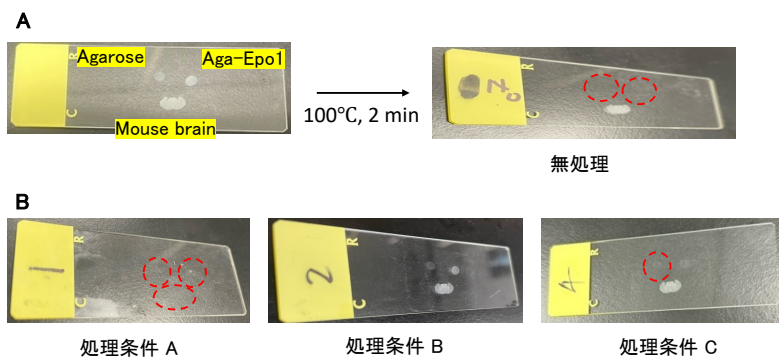


図3 iPaq gel 耐熱化処理の検討

(A) Agarose, Aga-Epo1 および mouse brain から作製したパラフィン包埋切片を 100°C, 2 min 加熱すると gel 由来の切片が溶解、消失する。
(B) 各種条件による処理後、加熱したのちの切片の残存を示した。処理条件 B では agarose 由来切片、マウス脳組織ともに良好に残存している。

〔9 研究結果（つづき）〕

さらに iPaq 法のプロトコルを再検証し、最適化をおこなった。既存の方法では Aga-Epo1 から作成した gel を 10 倍容量の抗原溶液に浸漬し結合させていた（post-link 法）。また、結合した抗原の定量について 2-mercaptoethanol を用いた溶出画分を作製し定量していた（elution 法）。いずれもゲル状の Aga Epo1 に対して抗原タンパク質の拡散が想定よりも低く十分な反応が得られていない可能性が想定された。これに対し、新たに Aga-Epo1 加熱 gel 形成時に抗原を同包し、高温ゾル状態の Aga-Epo1 と直接結合させる sim-link 法、抗原結合後の gel を直接溶解させサンプルとする melt 法を創案し試みた。その結果、sim-link 法により試用抗原量を 1/10 に減らすとともに、melt 法により短時間でかつ低濃度の結合タウもを検出可能となった。新たに確立したプロトコルを図4に示す。

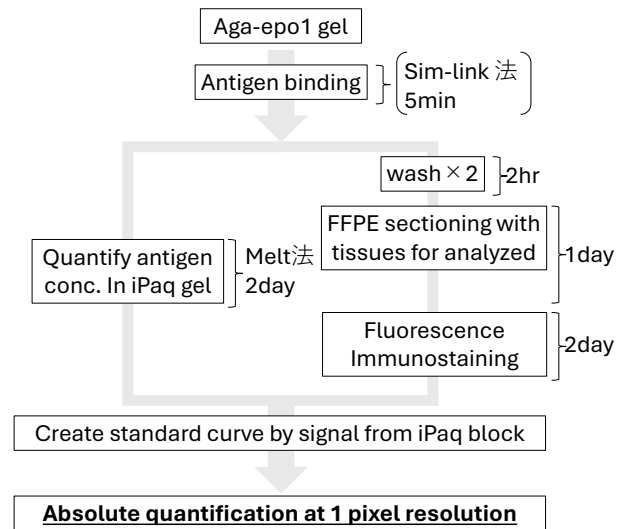
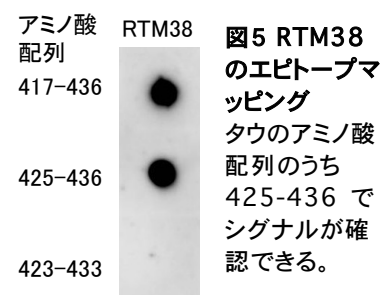


図4 iPaq 法の最適化プロトコル

(2) マウス脳におけるタウ/チューブリンの網羅的空間濃度決定

iPaq 法をタウ以外の抗体へ応用させるためには、抗原を合成ペプチドで賄うことが必須である。現在 iPaq 法で主に用いている RTM38 は、抗原賦活化を必要とせず高感度に組織中のタウを染色できる抗タウ抗体である。そのエピトープはタウの C-末端であるが詳細な配列は不明であった。iPaq 法の応用拡大を目指し、RTM38 のエピトープの同定を行った。その結果、タウの配列（2N4R:441 アミノ酸相当）の ⁴²⁵Leu～⁴³⁶Leu の配列に存在する事を明らかとした（図5）。この部位のペプチドを合成し、iPaq 解析に供する。



MAP2 はタウのパラログであり、共通とする微小管重合促進能の他タウは軸索に、MAP2 は樹状突起にと異なる局在を示す。また、病理学的にはタウの蓄積に伴い、細胞体や樹状突起から消失することが知られていることから、タウ病変形成機構の解明において iPaq 法で解析すべきタンパク質である。この絶対定量を目的とし、長鎖 isoform である MAP2b リコンビナントタンパク質の精製を行った。その結果、IPTG による発現誘導後、①可溶性画分の回収、②熱耐性画分を回収し ③20% 飽和硫酸アンモニウム沈殿画分を得ることで、western blot 法による定量には十分な純度のマウス MAP2b 42.476 μg の精製に成功した。今後、生化学的手法および iPaq による MAP2 の定量に供する。

iPaq 解析の対象とする PS19 系統タウトランスジェニックマウスは同志社大学からの移設を完了し、現在繁殖を進めている。同腹の野生型マウスとともに解析に用いる。

タウの *in vitro* 凝集系は、タウの微小管結合領域を中心とした $^{297}\text{Ile}\sim^{391}\text{Glu}$ からなる 95 残基のフラグメント（dGAE）を用いた系が超微形態的にもアルツハイマー病脳で認められる Paired Helical Filament と同等であり、現在最も適切とされている。dGAE の精製を試み、IPTG による誘導後、①陽イオン交換クロマトグラフィー、② Mw. 30,000 のフィルターを用いた限外濾過のフロースルー画分を得ることで、高純度の dGAE を 8.60 mg/mL (>1.5 mL) 精製した（図6）。さらに *in vitro* 線維形成を試みており、作製されたタウ線維を凝集シードとし、タウ凝集細胞の作製と iPaq 法による解析に供する予定である。

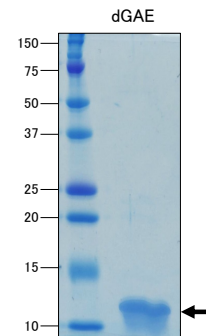


図6 dGAE タウフラグメントの精製
タウのアミノ酸配列 297-391 からなるフラグメントについて高純度での精製を達成した。

(3) マウス脳におけるチューブリン発現抑制系の導入と病態解析

タウの異常化の原因としてタウに帯するチューブリンの局所的な発現比の低下が想定される。チューブリンは細胞骨格微小管の構成単位であり、通常 α チューブリンと β チューブリンのダイマーからなる。神経細胞で最も高濃度に発現するタンパク質であり、8種類の α チューブリン、10種類の β チューブリン遺伝子から構成される。また、その発現量は厳密にコントロールされている。したがって、その人為的な発現抑制には RNAi などの直接的なアプローチは不可能である。これに対してチューブリンシャペロンの1つである Tbce のノックダウンによる *de novo* 合成阻害を検討した。子宮内電気穿孔法の技術移転に時間を要しているため、あらかじめ導入済みのマウス脳を用いてその効果を検証した。その結果、想定したシステムによる Tbce ノックダウンではタウの蓄積に対して十分な効果は認められなかった（図7）。チューブリン発現抑制の有効なシステム構築に向けて新たな実験系の構築をすすめる。

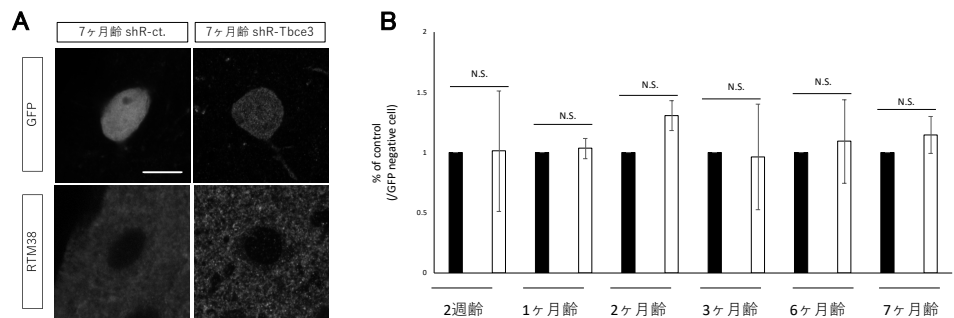


図7 Tbce ノックダウンのタウ細胞体蓄積への影響

(A) IUE により導入された EmGFP-shR-Tbce 導入の効果。7ヶ月例における EmGFP の発現とタウの染色像。

(B) Control (close) および Tbce shR (open) における時系列変化。Means $\pm$ SE (n = 3)

(4) タウ異所性発現モデルの作成と解析

神経細胞体及び樹状突起におけるタウの異常発現の例として培養神経細胞にグルタミン酸刺激を与えることによって、樹状突起内のタウ mRNA の翻訳活性が局所的に短時間で増加することが見出されている。本研究で行う iPaq 法では組織切片を対象とし、また用いる抗体はそれに適したものを使用する。そこでまず、iPaq 法でタウの検出に使用する抗体である RTM38 でもグルタミン酸によるタウの樹状突起内翻訳活性化が検出できるのか確認を行った。12日間分化させたマウス海馬由来神経細胞を 0.5 mM のグルタミン酸で5分間処理後、培地を入れ換え25分間インキュベートした。その後細胞を固定し、免疫染色を行いタウの樹状突起内発現量を解析した。そ

〔9 研究結果（つづき）〕

の結果、今回用いた抗体でもタウの樹状突起内発現量がグルタミン酸処理によって大きく増加することが確認できた（図8）。グルタミン酸受容体は Ca^{2+} 透過性の NMDA 型グルタミン酸受容体、主に Na^{+} 透過性の AMPA 型グルタミン酸受容体、代謝調節型グルタミン酸受容体に大別される。現在、グルタミン酸のほかに NMDA と AMPA の影響についても解析を行っている。まだ解析途中ではあるが、どちらの場合でも樹状突起内発現量の増加を示唆するデータが得られている。今後はさらに KCl などを用い脱分極刺激だけでも翻訳の活性化が起こるのか、また代謝調節型グルタミン酸受容体の影響についても解析を行う予定である。

本研究ではタウの発現変化について海馬培養スライスで再現することを目指している。はじめに培養スライスの作製および培養・解析条件を確定した。はじめに、スライス標本を採取するマウスの日齢について検討した。タウの軸索局在は生後7日目（7d）から14日目（14d）にかけて完成する。7d, 14d から採取した急性海馬スライスについてタウの局在を確認した。その結果、7d から 14d にかけて CA3 領域では細胞体にあたる Pyramidal cell layer と軸索にあたる mossy fiber にタウ染色強度の高いコントラストが形成された（図9）。タウの異所性発現の再現には定常状態で十分な軸索局在が完成されていることが必須である。また、同スライスの歯状回では神経細胞の発生段階に応じたタウの局在変化が検出された。これより、生後14日齢から得られた海馬スライスであれば CA1～CA3 または DG を対象とした局在解析が可能であると判断した。また、スライス作成後の培養の影響について検討したが、1日の培養であっても錐体細胞に重篤な形態異常が認められた。したがって以後の実験には生後14日齢から得られた急性海馬スライスを用いる事とした。現在グルタミン酸の効果について検討中であり、タウの発現変化が認められれば速やかに iPaq 解析につなげる予定である。

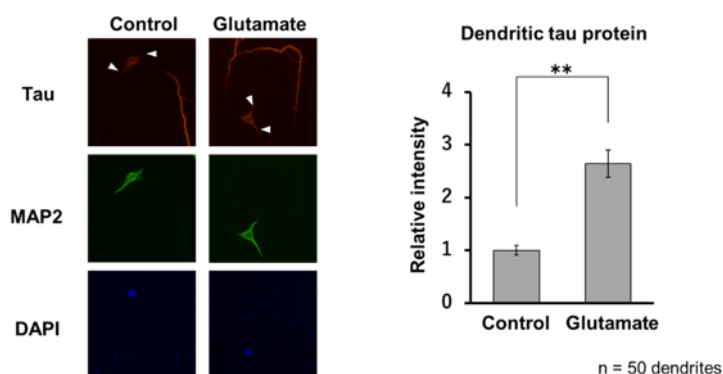


図8 グルタミン酸による樹状突起内タウの発現量変化
0.5 mM グルタミン刺激後の樹状突起におけるタウの発現誘導について RTM38 を用いて検出した。

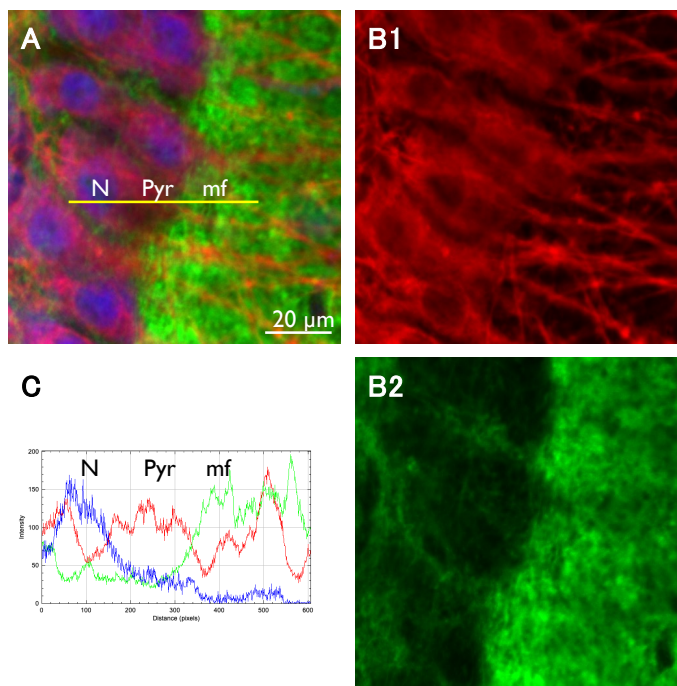


図9 海馬急性スライスにおけるタウの局在
生後14日齢から得られた海馬スライスについて RTM38 (G), anti-MAP2N (R), anti-NeuN(B) を用いて多重染色を行った。タウの局在を調べた。また merge 画像 (A, B1, B2) をもとに line scan による各染色強度の比較を行った (C)。タウは主に軸索成分である mossy fiber (mf) に局在し、MAP2 陽性の細胞体、樹状突起とは異なる局在を呈する。

本研究の目指すべき問いは、アルツハイマー病脳におけるタウ異常化のステップを明らかとすることである。これまでの解析から、正常神経細胞におけるタウは微小管他なんらかの因子（タンパク質）と会合することでタウ同士の凝集がおこらない状態を保っていると考えられる。逆にアルツハイマー病脳の変性神経細胞では、このような因子に対するタウの過剰がおこり、フリーとなったタウがその後の神経毒性を引き起こす可能性がある。この検証を目的とした培養細胞を用いた実験系の構築を行った。タウを過剰発現し、凝集体を形成する細胞株 G1F1B を導入し、すでに同定済みのタウ結合因子を発現させ、凝集阻害効果の検証を行った。結合因子は DsRed との融合タンパク質として発現させ、赤色蛍光の明るさで評価した。一方、タウは GFP と融合させており、その凝集体の大きさは緑色蛍光で評価した。その結果、Factor A および Factor B と融合させた DsRed を発現させるとタウ凝集を抑制する傾向が認められた。今後は他のタウ結合因子についても解析し、各因子のタウに対する発現量比と凝集傾向の関係について化学量論的な検証を進める予定である。

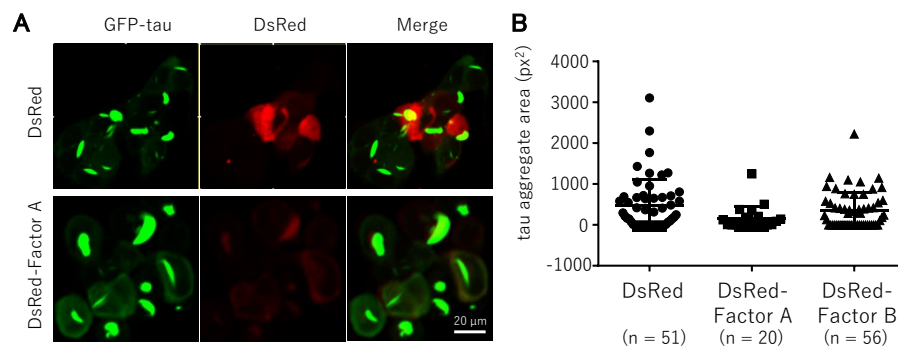


図10 タウ結合因子によるタウ凝集阻害作用
(A and B) G1F1B 細胞では自発的にタウの凝集を形成する。DsRed または DsRed とタウ結合因子 (Factor A or B) を融合させたタンパク質を発現させ、赤色蛍光の発現とタウ凝集体の大きさについて定量した。